

Tartu Ülikool
Psühholoogia instituut

Madli Nuut

**Serotoniini 5-HT_{1A} -retseptorite tundlikkus palju- ja väheuudistavatel
katseloomadel ja locus coeruleus'e denervatsiooni efekt**

Uurimustöö

Juhendajad: Jaanus Harro, Kadri Kõiv

Läbiv pealkiri: *locus coeruleus*'e efekt palju-ja väheuudistavatel katseloomadel

Tartu 2015

Serotoniini 5-HT_{1A} -retseptorite tundlikkus palju- ja väheuudistavatel katseloomadel ja *locus coeruleus*'e denervatsiooni efekt

KOKKUVÕTE

Käesolevas eksperimendis uuriti hüpotermilist efekti 8-hüdroksüül-2-(di-n-propüülamino)tetralliini (8-OH-DPAT) manustamisel katseloomadele, kes erinesid uudistamisaktiivsuse poolest. Samuti vaatasime monoamiinide taset rakkude välises ruumis pärast *locus coeruleus*'e denervatsiooni (DSP-4, 10 mg/kg ja 30 mg/kg) ning seda, kas võimalikud muutused on seotud loomade uudistamisaktiivsusega. 33 isasest Wistar rotist moodustati kolm gruppi, katsete järjekord oli tasakaalustatud ladina ruudu alusel. Esimeses eksperimendis manustati kõigile rottidele nädalase vahega 8-OH-DPAT annuses 0.1 mg/kg või 0.3 mg/kg või lahustit ning mõõdeti rektaaltemperatuuri enne süsti (T0), 30 minutit peale süsti (T30) ja 60 minutit peale süsti (T60). Teises eksperimendis manustati katseloomadele närvimürki (N-2-klooretüül)-N-etüül-2-broombenzüülamiin (DSP-4) ja tekitati *locus coeruleus*'e denervatsioon. Katseloomad jagati kolme gruppi. Katsegruppides loomadele manustati 10mg/kg või 30mg/kg kohta DSP-4 ja kontrollgrupile manustati lahustit. Selgus, et närvimürk DSP-4 mõjus noradrenaliini (NA) tasemele nii hipokampuses [$F(2,12)=76.7$, $p < 0.01$], kui frontaalkoores [$F(2,12)=18.7$, $p < 0.01$], vähendades oluliselt NA kontsentratsiooni ajukoos. Esimeses eksperimendis, 8-OH-DPAT manustamise tulemusena tekkis suure annuse (0.3 mg/kg) puhul hüpotermia, väike annus (0.1 mg/kg) vähendas hüpertermiat. Uudistamisaktiivsuste ja temperatuurimuutuste vahel seost ei ilmnenud, küll aga kaldus tendents vähe-uudistavate (LE) katseloomade poole, mis viitab nende 5-HT_{1A} retseptori suuremale tundlikkusele.

Märksõnad: Serotoniin, noradrenaliin, 5-HT_{1A}, hüpotermia, 8-OH-DPAT, uudistav käitumine, DSP-4, prefrontaalne korteks, *locus coeruleus*, LC, KCl stimulatsioon, mikrodialüüs

ABSTRACT

Sensitivity of serotonin 5-HT_{1A} receptor in low-and high exploratory rats and the effect of *locus coeruleus* denervation

The purpose of this study was to investigate the hypothermic effect of 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in rats with different exploratory behavior. Also, levels of monoamines in extracellular space after *locus coeruleus* denervation (DSP-4, 10 mg/kg and 30 mg/kg) were measured and it was examined whether these changes are associated with exploratory activity in rats. Thirty three male Wistar rats were allocated into three groups and experiments were balanced on basis of Latin square. All rats were administered 8-OH-DPAT dose of 0.1 mg/kg or 0.3 mg/kg or saline with one week interval and rectal temperatures were taken before (T0), 30 minutes after (T30) and 60 minutes after (T60) injection. In the second experiment, animals were administered neurotoxin DSP-4 (N-2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine) which caused *locus coeruleus* denervation. Animals were divided into three groups. Animals in neurotoxin treatment groups were administered 10 mg/kg or 30 mg/kg DSP-4 and saline was given to the control group. Results showed that the neurotoxin DSP-4 affected noradrenaline (NA) levels in hippocampus [$F(2,12)=76.7$, $p < 0.01$] and frontal cortex [$F(2,12)=18.7$, $p < 0.01$], decreasing NA concentrations substantially in the brain tissue. Administration of 8-OH-DPAT caused hypothermia in case the high dose (0.3 mg/kg) but the lower dose (0.1 mg/kg) reduced the stress-induced hyperthermia. No association between exploratory activity and changes in body temperatures was revealed, but there was tendency toward low exploratory (LE) rats, which refers to higher sensitivity of 5-HT_{1A} receptor.

Keywords : Serotonin, noradrenaline, 5-HT_{1A}, hypothermia, 8-OH-DPAT, exploratory behavior, DSP-4, prefrontal cortex, *locus coeruleus*, LC, KCl stimulation, microdialysis

SISSEJUHATUS

Depressiooni monoamiinergiline hüpotees

Suurenenud negatiivsete emotsioonide kogemine, ärevus, huvid ja elurõõmu kadumine on levinumateks sümptomiteks depressiivse fenotüübi puhul (Hasler et al., 2004). Nende omaduste ülekandmine loomadele (Gould and Gottesman, 2006) ja individuaalsete erinevuste uurimine käitumises, füsioloogias ja geneetilisel tasandil on aidanud selgitada depressiooni substraati ja selle patogeneetilisi mehhanisme (Harro, 2010). Depressiooni monoamiinergiline hüpotees postuleerib, et see haigus on põhjustatud serotoniini (5-HT), noradrenaliini (NA) ja dopamiini (DA) signaalide defitsiidist ajus. Nende monoamiinide seast serotonergilise süsteemi roll meeleoluhäirete psühhopataloogias ja ravis on üks kõige enam uuritud. On märgatud depressioonis patsiente, kellel on oluliselt vähenenud 5-HT kontsentratsioon plasmas (Sarrias et al., 1987), mis peegeldab vähenenud serotonergilist ülekannet ajus. Kui depressioon on põhjustatud neurotransmitterite madalast tasemest, peaks haiguse sümptomid vähenema monoamiinide taseme tõusuga (Hall, 1998).

Monoamiini-teooria on aidanud mõista monoamiinide tagasihaarde inhibiitorite toimemehhanisme (Hinz et al., 2012), kuid ei selgita seda täielikult ega anna ulatuslikku arusaama depressiooni patofüsioloogiast (Hindmarch, 2002). Sellest tulenevalt pakuti järgnevalt välja düsregulatsiooni teooria (Siever ja Davis, 1985), mis kaasas mitmeid neurotransmittereid, sealhulgas NA-ergilisi, 5-HT-ergilisi ja isegi DA-ergilisi närviradu ning mille kohaselt on depressioon põhjustatud erinevate ajupiirkondade (frontaalkoore, hipokampuse, amügdala, basaalganglionite) väärtalitusest, mida moduleerivad monoamiinergilised süsteemid (Delgado ja Moreno, 2000). Nende ajustruktuuride normaalne talitus sõltub paljudest faktoritest, aga suurt mõju avaldab ka stress.

Depressiooni uurimine

Senini ei ole veel loodud mudelit, mis indutseeriks kõiki depressiooni sümptomeid katseloomadel. Selle asemel hinnatakse kindlaid haiguse aspekte, nagu näiteks psühhomotoorset aktiivsust, muutuseid tunnetamises või selliseid funktsioone nagu söömine, magamine, muutused kehatemperatuuris ja sotsiaalne käitumine (Meyer ja Quenzer, 2004). Depressiooni sümptomeid on katseloomadel püütud esile kutsuda farmakone, ajustruktuuri kahjustamist, keskkonna muutusi, geneetilisi ning erinevaid

stressimanipulatsioone kasutades (Cryan et al., 2002; Willner ja Mitchell, 2002; Cryan ja Mombereau, 2004; Geyer ja Markou, 2000; Weiss ja Kilts, 1998; McKinney, 2001; Nestler et al., 2002). Selle juures on oluline, et loomadele esilekutsutud depressiooni sümptomeid oleks võimalik kergesti mõõta ja tõlgendada (Duman, 2010). Stress on oluline riskifaktor, mida seostatakse depressiooniga. Selle tõttu on üritatud stressi abil loomadel esile kutsuda põhilisi depressiooni sümptomeid (Duman, 2010). Stressi mõju hindamiseks kasutatud testidest on tänapäeval laialdaselt kasutatusel sundujumise test, avarvälja test, sotsiaalse allutatuse test.

Uudistamisaktiivsuse mudel ja individuaalsed erinevused

Depressioon on väga kompleksne haigus ja on palju inimesi, kellele traditsioonilised antidepressandid mõju ei avalda (Fava & Offidani, 2011), mis viitab individuaalsetele erinevustele selle haiguse patogeneesis. Seetõttu on vaja lisaks üldmehhanismidele uurida ka faktoreid, mis muudab indiviidi stressile tundlikumaks. Rottide puhul on üheks meetodiks uudistamiskäitumise uurimine, mis mõõdab looma aktiivsust uudses keskkonnas. Selle põhjal on võimalik loomad jagada väheuudistavateks (LE) ja palju-uudistavateks (HE) loomadeks. Uudistamisfenotüüp on üldiselt püsiv, vähenedes küll kõrge uudistamiskäitumisega loomadel mõningal määral vanuse kasvades (Mällo et al., 2007). Madala uudistamisaktiivsusega loomad ilmutavad plusspuuri testis kõrgemat ärevust ning sundujumise testis rohkem liikumatust võrreldes kõrge aktiivsusega rottidega, mis viitab sellele, et kõrgema uudistamisaktiivsusega loomadel on stressi ja ärevuse baastasemed madalamad kui väheuudistavatel loomadel (Mällo et al., 2007).

Serotoniini 5-HT_{1A} retseptori agonist 8-OH-DPAT

5-HT süsteemi mikrodialüüsi uuringud LE/HE mudelis on ilmutanud rakkudevälise 5-HT taseme diferentsiaalseid regulatsioone eesmises ajukoores ja hipokampuses (Mällo et al., 2008). Nii loom-, kui inimuuringutes on leitud 5-HT_{1A} retseptori düsfunktsiooni ärevuse patofüsioloogias ja depressioonis (Lesch and Gutknecht, 2004; Akimova et al., 2009). 5-HT_{1A} retseptor on teiste funktsioonide kõrval kaasahaaratud kehatemperatuuri moduleerimisse (Lin et al., 1998; Cryan et al., 1999) ja stressi poolt indutseeritud hüpertermiasse. On leitud,

et 5-HT_{1A} retseptori agonistid vähendavad lühiajalist kehatemperatuuri tõusu, mis on tekkinud vastusena stressorile (Olivier et al., 2003 ; Hjorth, 1985; Cryan et al., 1999). On raporteeritud, et 8-hüdroksüül-2-(di-n-propüülamino)tetralliini (8-OH-DPAT) manustamine tekitab antidepressanditaolist toimet, seda on märgatud näiteks sundujumise testis (Matsuda, 1995; O'Neill and Conway, 2001; Redrobe; Bourin, 1998) ja õpitud abituse testis (Joca et al., 2003; Martin et al., 1990), kuigi tuleb märkida, et efekt ei ilmnenud kroonilise stressi puhul (Przegaliński et al., 1995), mis on vahendatud presünaptilise 5-HT_{1A} retseptori aktivatsiooni poolt: hüperfaagia ja rahustav toime rottidel ja liivahiirtel (Luscombe et al., 1993; Matsuda et al., 1995), mis on esile kutsutud 8-OH-DPAT poolt (Lucki et al., 1994). Uuemad antidepressantide uuringud on koondatud farmakoloogiliste strateegiate arendamisele, mis ei nõua pikka mõjuaega enne, kui sümptomid taanduvad . Mõned nendest strateegiatest proovivad kiirendada autoregulaatorsete protsesside mahasurumist, teised aga nendest mööda minna. Need strateegiad hõlmavad 5-HT ja NE tagasihaarde blokeerijate kombinatsioone (Guelfi et al., 1995; Nelson et al., 1991) . Paljud teadlased on uurinud 5-HT retseptorite rolli antidepressantide toimes. 5-HT_{1A} ja 5-HT₂ retseptoritel on eesajus postsünaptiliselt tavaliselt vastupidine toime, mis on vastavalt pärssiv ja ergutav (Araneda ja Andrade, 1991).

Neurotoksiini DSP-4 ja monoamiinide sisaldused ajukoes

Üheks peamiseks depressiooni patogeneesi arengu põhjuseks peetakse keskse noradrenergilise süsteemi regulaarse aktiivsuse nõrgenemist *locus coeruleus*'e (LC) piirkonnas (Harro ja Oreland, 2001). Kuna depressiooni, ravimisõltuvust ja Parkinsoni tõve seostatakse dopaminergilise neurotransmissiooni muutustega noradrenergilises *locus coeruleus*'e projektsioonides (Harro J. , Terasmaa A. , Eller M. , Rinken A.) on uuringutes kasutatud neurotoksiini DSP-4, mis on selektiivne just LC projektsioonidele. Mõju LC noradrenergiliste ja mesotelentsefaalsete dopamiinergilistele süsteemidele toimib eesajukoore kaudu. Dopamiini vallandumine eesajukoores reguleeritakse lokaalsete noradrenergiliste närvilõpmete abil (Gresch et al., 1995) ja LC neuronite elektriline stimuleerimine suurendab nii rakkude välist dopamiini, kui noradrenaliini eesajukoores (Devoto et al., 2005).

Uurimuse eesmärk

Käesoleva uuringu eesmärgiks on uurida stressist tingitud hüperterima tundlikust 5-HT_{1A} retseptorile ja muutused on seotud vähe-ja palju uudistavate (LE/HE) katseloomadega, kus väheuudistavad loomad näitavad ärevuse-ja depressioonisarnast fenotüüpi. Samuti tahame teada kuidas muutub monoamiinide tase rakkude välises ruumis pärast neurokeemilisi manipulatsioone (DSP-4 manustamine, *locus coeruleus'*e denervatsioon) ning kas need muutused on tingitud loomade uudistamisaktiivsusest.

Uurimisküsimused

1. Kuidas mõjutab serotoniini agonisti 8-OH-DPAT erinevad annused (0.1 mg/kg; 0.3 mg/kg) või lahus vähe-ja palju uudistavate katseloomade rektaaltemperatuurimuutusi ($\Delta T^{\circ}\text{C}$), mis on mõõdetud erinevatel ajahetkedel?
2. Kas monoamiinide ning nende metaboliitide kontsentratsioonid erinevad eri uudistamisaktiivsusega ja *locus coeruleuse* osalise kahjustusega loomade vahel?

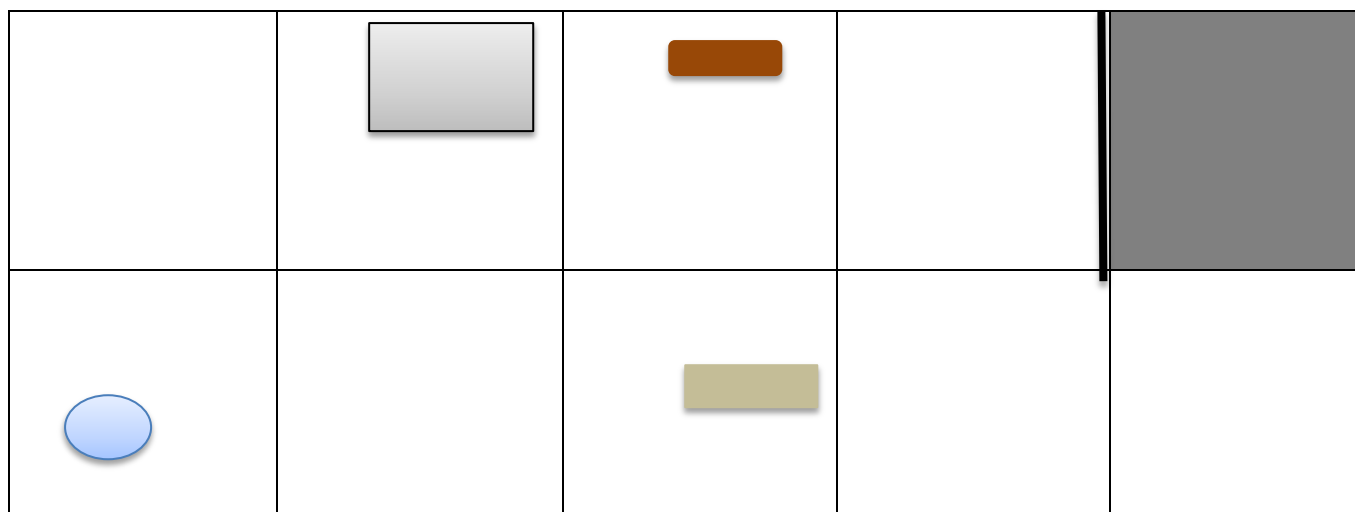
MEETOD

Katseloomad

33 isast Wistar liini rottid olid esmalt majutatud neljakaupa Biomeedikumi vivaariumisse läbipaistvatesse polüpropüleenist puuridesse. Ruumis kus katseloomi hoiti, oli automatiseeritud 12-tunnine valguse/pimeduse tsükkel (tuled läksid põlema 8:00 hommikul) ja temperatuur oli stabiilselt $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Toit (R70 Lactamin, Rootsi) ja vesi oli rottidele koguaeg kättesaadav. Katsed viidi läbi rottidega 2013.a. märtsis ja 2014.a. märtsis, aprillis ja mais, kellaajalises vahemikus 9:00 kuni 17:00. Eksperiment oli heaks kiidetud Põllumajandusministeeriumi loomkatse-loakomisjoni poolt.

Katseseade

Rottide uudistamisaktiivsuse mõõtmiseks kasutati uudiskasti (Joonis 1). Uudiskast on ristkülikukujuline metallist kast, kus ühel küljel on „kodupuur“, mille põhja katab saepuru. See peaks rotile varjualust pakkuma ning on koht, kuhu loom katse alguses sisse pannakse. Suure kasti pind on jagatud kaheksaks ruuduks ning neis asub 3 uudset ja 1 tuttav objekt – vastavalt klaaspudel, madal pappkarp, puuklots ja toidupala. Eksperimentaator mõõdab rottide uudistamisaktiivsust kahe stopperi abil. Esimese neist paneb käima sama hetkel kui katselooma kasti paigutab ning jääb jooksmata 15 minutiks, mis on iga looma puhul katseaeg. Teine stopper aga mõõdab reaalselt väljaspool väikest kasti ringi uudistavat aega. Iga kord kui loom jääb seisma, end peseb, sööb või läheb tagasi „kodupuuri“, tuleb aeg seisma panna. Samaaegselt on eksperimentaatori ülesandeks üles märkida kõik „kodupuurist“ väljumise üritused (1), jooneületused (2), tagakäppadele tõusud (3), objekti uudistamised (4) ja tagasi „kodupuuri“ sisenemised (5). Pärast roti eemaldamist uudiskastist puhastatakse kast niiskete paberkäterätikutega.



Joonis 1. Uudistamiskäitumist mõõtvate katseseadme skeem.

Uudistamiskäitumine

Selleks, et selekteerida rotid kõrge uudistamisaktiivsusega (HE) ja madala uudistamisaktiivsusega (LE) gruppi, tuli mõõta kõigi rottide uudistava käitumise summa (*sum of exploratory activity*). Esimene uudistava käitumise eksperiment toimus siis, kui rotid olid 2 kuused (üldine katseplaan on toodud tabelis 1). Iga päev antud vahemikus kaaluti kõik rotid vahetult üle. Esimesed mõõtmised viisid läbi Kadri Kõiv ja Kai Tiitsaar. Teise uudistava käitumise kordusmõõtmise viis läbi Madli Nuut, mille tulemusi kasutasin ka andmete analüüsimisel.

Tabel 1. Üldine katseplaan

katsepäev	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Toiming	Uudistamis käitumine 2.k	8-OH-DPAT manustamine 0/0.1/0.3mg/kg	8-OH-DPAT manustamine 0/0,1/0,3mg/kg	8-OH-DPAT manustamine 0/0.1/0.3mg/kg	Uudistamiskäitumise kordus testimine	DSP-4 /vechile süst 0/10/30mg /kg kohta	Mikrodiaüüs

Eksperiment 1

SIH protseduur ja 5-HT_{1A} retseptori tundlikkus

Serotoniini retseptori 1A tundlikkuse mõõtmiseks kasutati serotoniini 1A agonist 8-hüdroksüül-2-(di-n-propüülamiin)tetralliini (8-OH-DPAT), mida süstiti katseloomadele erinevas annuses (0/0.1/0.3 mg/kg) nädalase vahega kolmel korral ladina ruudu alusel. Iga katselooma jaoks mõõdeti vastavalt kaalule sobiv kogus, mis sisaldas 0.1 mg/kg või 0.3 mg/kg 8-OH-DPAT-i või NaCl lahust ja süst tehti kõhuõõnde. Enne süsti kaaluti rotid ja mõõdeti rektaaltemperatuur (T0). Temperatuurid võeti uuesti 30 minutit pärast süsti (T30) ja 60 minutit pärast süsti (T60). Mõõtevahendina kasutati manuaalselt paigaldavat temperatuuriadurit (YSI, 400 seeria), mis sisendati õrnalt 5cm sügavusele roti pärasusse ning hoiti seal 1 minuti vältel. Temperatuurid olid nähtavad juhtseadme kaudu (HB 101, Panlab, Harvard Apparatus). Rotid paigutati kohe pärast mõõtmist tagasi oma üksikmajutusega puuri ja puhastati katseseadmed ning pinnad.

Eksperiment 2

LC projektsioonide kahjustuse mõju NA rakuvälistele tasemetele prefrontaalkoores

Locus coeruleus'e projektsioonide osaliseks kahjustamiseks kasutati närvimürki DSP-4 (N-2-klooretüül)-N-etüül-2-broombenzüülamiin, mida süstiti katseloomadele 11 päeva enne mikrodialüüsi. 10 mg/kg ja 30 mg/kg manustamiseks kaaluti toksiin iga looma kohta eraldi välja, lahustati destilleeritud vees ja süstiti kohe pärast lahustamist kõhuõõnde. Kontrollgrupi rottidele süstiti destilleeritud vett. Närvimürgi süsti sai kokku 16 looma. Loomade jagunemine käitumiskatsete analüüsimiseks on ära toodud tabelis 2.

Tabel 2. Loomade jagunemine katsegruppidesse

	DSP-4	LAHUSTI
Kõrge uudistamisaktiivsus	9	2
Madal uudistamisaktiivsus	7	4

Mikrodialüüs

Katseloomad uinutati ketamiini (45 mg/kg i.p.) ning medetomidiini (0.2 mg/kg i.p.) kombineeritud lahusega. Peale loomade uinutamist paigutati mikrodialüsaadi sond vasakusse prefrontaalse korteksi piirkonda (koordinaadid AP: +3.3; ML: +0.8; DV: -5, Paxinos and Watson (1986) Brain Atlas of Rat.), standardse kirurgilise tehnikaga. Pärast operatsiooni paigutati loomad üksikmajutusega puuridesse (21 × 36 × 18 cm). Mikrodialüsaadi sondist voolutati läbi modifitseeritud Ringeri lahust (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM NaH₂PO₄; pH 7.20-7.22). Pärast stabiliseerumise perioodi (1h) koguti proove iga 15min tagant, iga looma kohta koguti kokku 20 proovi. Pärast 9. proovi kogumist lülitati süsteem tunniks ajaks kaaliumirikkale (50 mMol KCl) lahusele. Pärast eksperimendi lõppu loomad dekapiteeriti, nende ajud eemaldati koljudest ja külmutati -80°C juures. Sondide asukohad määrati Paxinos ja Watson (1986) atlase abil. Teine pool aju tükeldati jääs ning kasutati monoamiinide ja nende metaboliitide *ex vivo* määramiseks.

Monoamiinide NA, DA ja 5-HT ja nende metaboliitide *ex vivo* määramine

Noradrenaliini, dopamiini ja serotoniini kogused proovides määrati kasutades HPLC-d koos elektrokeemilise detekteerimisega. Proovid koguti 15 minuti vältel ja säilitati -80 °C juures. Kromatografeerimissüsteem koosnes Shimadzu LC-seeria lahustipumbast, Luna C18(2) 5 µm kolonnist (150x2mm), mis hoiti temperatuuril 30 °C ja Decade II digiaalsest amperomeetrisest detectorist (Antec Leyden BV, Holland) koos elektrokeemilise läbivoolurakuga VT-03 (2 mm GC WE, ISAAC võrdlev elektrood, Antec Leyden BV, Holland). Mobiilne faas sisaldas 0.05 M naatrumtsitraatbuffrit pH 5.3, 2 mM KCl, 0.02 mM EDTA, 3.5 mM naatruimoktaansulfanaadist ja 12.5% atsetonitrilist. Mobiilne faas filtreeriti läbi 0.22 µm poori suuruse filtri (tüüp GV, Millipore, USA) ja pumbati läbi kolonni kiirusega 0.2 ml/min. Proovid süstiti kolonni ja mõõdeti süsinik-klaas-tööelektroodiga, mis hoiti potentsiaali +0.4V juures Ag/AgCl võrdluses elektroodi suhtes. Andmed saadi kasutades Shimadzu LC Solution-süsteemi. NA, DA, 5-HT kontsentratsioonid saadi võrreldes piigi kõrgusi välisstandarditest teada kontsentratsioonidega (Sigma, Šveits).

Noradrenaliini tasemete mõõtmine koeproovidest kõrgsurve vedelik komatograafia (HPLC) abil

Monoamiine ja nende metaboliite uuriti kõrgsurve vedeliku kromatograafiaga (HPLC) koos elektrokeemilise (amperomeetrilise) detekteerimisega. Roti ajukoed homogeniseeriti ultraheli-homogenisaatori abil (Bandelin Sonopuls, Bandelin Electronic, Berlin, Germany) 0.1 M perkloriid (30 µl/mg) jääkülmas lahuses, mis sisaldas 5mM naatriumvesiniksulfitit ja 0.4 mM EDTA-d vältimaks oksüdatsiooni. Seejärel homogenaadid tsentrifuugiti 14000 pööret/minutis 10 minuti vältel temperatuuril 4 °C . Saadud supernaatanti alikvoodid (10µl) kromatografeeriti Luna C18(2) (150x2mm, 5 µm) kolonniga. Lahutamine tehti isokraatses elueerimisrežiimis kolonnitemperatuuril 30 °C, kasutades liikuvat faasi, mis sisaldas 0.05 M naatriumtsitraatbuffrit pH 3.7 juures, 0.02 mM EDTA-d, 1 mM KCl, 1 Mm naatriumoktaansulfanaati ja 7.5% atsenonitriiti. Kromatograafiasüsteem koosnes isokraatsest pumbast (Hewlett Packard HP 1100), automaatproovivõtja temperatuuriregulaatoriga (HP1049) kolonnist elektrokeemilise detektoriga (Agilent, Waldbronn, Saksamaa) koos süsinik-klaaselektroodiga. Mõõtmised tehti elektripotentsiaali + 0.7 V juures Ag/AgCl võrdluselektroodi suhtes. Detekteerimise piirid signaalimüra suhte kohta (S/N) =3 olid järgmised: 0.08 pmol/mg kudet DA ; 0.10 pmol/mg kudet HVA jaoks; 0.05pmol/mg kudet DOPAC jaoks; 0.08pmol/mg kudet 5-HT jaoks; 0.04pmol/mg kudet 5-HIAA jaoks.

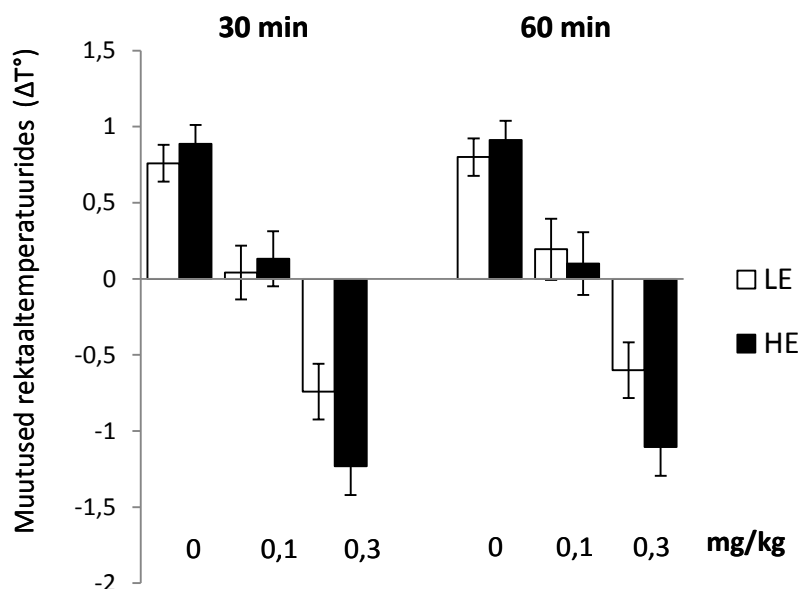
Statistiline analüüs

Andmeanalüüsiks kasutasin IBM SPSS20 ja jooniste tegemiseks Microsoft Excel 2010. Monoamiinide ja nende metaboliitide sisalduste gruppidevaheliste erinevuste hindamiseks kasutasin ühefaktorilist ANOVAt, mille sõltumatuks muutujaks oli DSP-4 annus ja sõltuvateks muutujateks monoamiinide (NA, DA, 5-HT) sisaldused frontaalkoores ja hipokamuses. Mikrodialüüsist kogutud proovide andmeid analüüsisin korduvmõõtmistega ANOVA abil. Hüpotermilise efekti ja selle seost uudistamisaktiivsusega analüüsisin korduvmõõtmistega ANOVAGA, kus sõltuvaks muutujaks oli temperatuurimuutus ($\Delta T^{\circ}C$) ja sõltumatuks muutujaks uudistamisaktiivsuse klassifikatsioon (LE/HE). *Post hoc* testina kasutasin Tukey testi. Saadud tulemuste olulisusenivooks võtsin $p < 0.05$.

TULEMUSED

Stressist tingitud hüpertermia ja 8-OH-DPAT mõju

Katsetulemustest ootasime, et stressist tingitud hüpertermia sõltub rottide uudistamisaktiivsusest. Kuid tulemused näitasid, et ei esine olulist erinevust kõrge- ja madala uudistamisaktiivsuse ning hüpothermilise efekti vahel (Joonis2).



Joonis 2. 8-OH-DPAT (0 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg) manustamisest tekkinud hüpothermiline efekt (ΔT) kõrge (HE) -ja madala (LE) uudistamisaktiivsusega rottidel, mõõdetuna 30 ja 60 minutit peale süsti. $p > 0.05$

Küll aga näis toimivat serotoniini (5-HT) agonist 8-OH-DPAT. Väike annus (0.1 mg/kg) vähendas hüpertermiat ja suur annus (0.3 mg/kg) 8-OH-DPAT tekitas hüpothermia langetades rottide temperatuuri keskmiselt 3.005% võrra (T_0 - T_{60}). Rottide keskmine temperatuur enne süsti oli 36.6 °C, aga 60 minutit pärast 0.3 mg/kg annust oli see langenud 35.5 °C.

Lisaks vaatasin ka korrelatsioone uudistamisaktiivsuste ja temperatuurimuutuste (ΔT_{30} - ΔT_{60}) vahel. Kellel madalam delta(ΔT), nendel madalam uudistamisaktiivsus. Korrelatsioonid on välja toodud Tabelis 3. , kus on näha, et korreleerub kolmas uudistamiskord (3.päev) ja vastupidi.

Tabel 3. Spearman'i korrelatsioone illustreeriv tabel uudistamisaktiivsuse ja kolmel järjestikul nädalal (1.päev, 2.päev, 3.päev) mõõdetud rektaaltemperatuuride (pärast 30 ja 60 minuti möödumist) vahel pärast 5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT (0.1/0.3 mg/kg kohta) manustamist katseloomadele (N=33) . *p <0.05

	ΔT_{30}			ΔT_{60}		
	1.päev	2.päev	3.päev	1.päev	2.päev	3.päev
<i>Latentsus</i>	-0.35*	-0.35 *	-0.40*	-0.25	-0.32	-0.37*
<i>Aeg</i>	0.27	0.20	0.44*	0.21	0.13	0.37*
<i>Uudistamis-aktiivsuse summa</i>	0.31	0.16	0.47*	0.22	0.15	0.43*

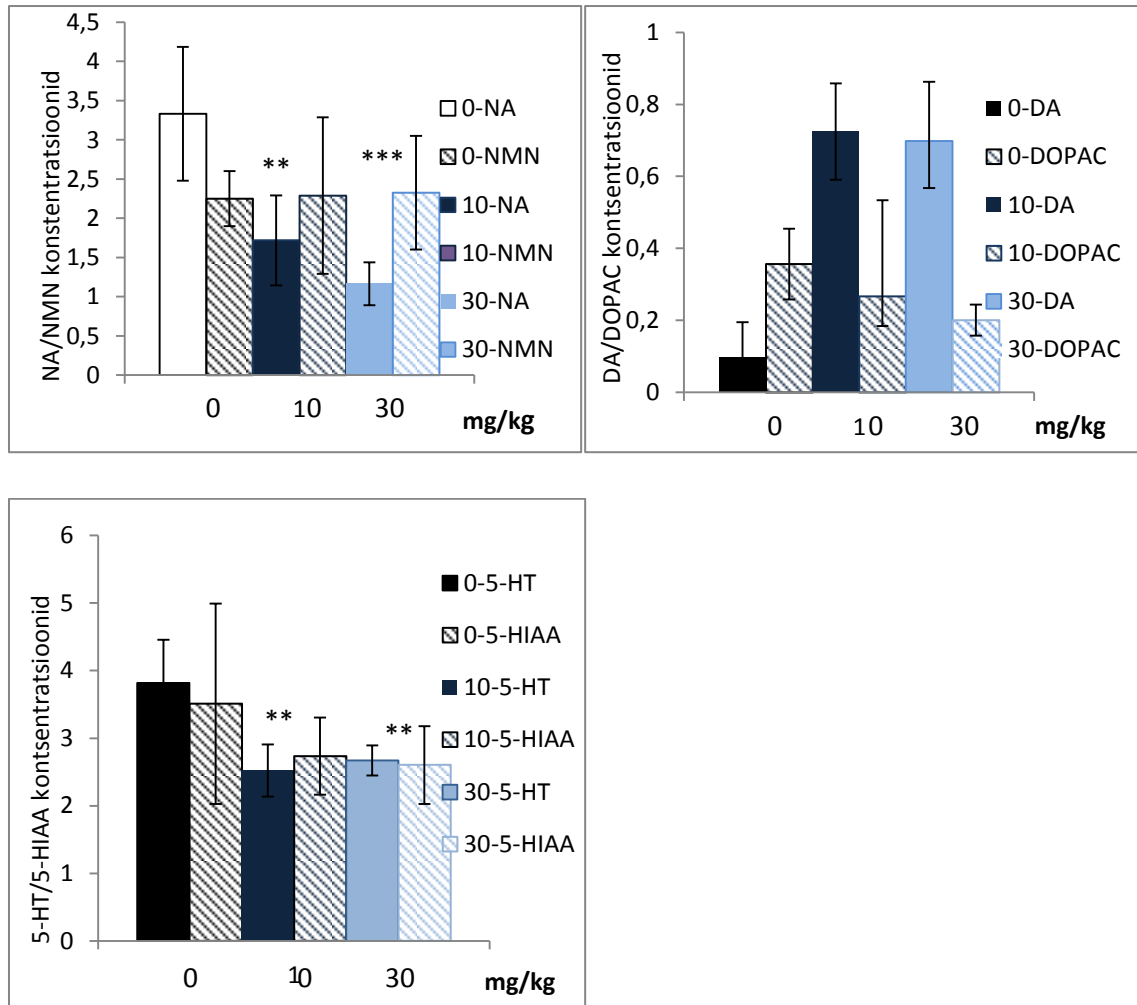
Monoamiinid ja nende metaboliitide tasemed pärast DSP-4 manustamist

Monoamiinide ja nende metaboliitide kontsentratsioone ajukoes illustreerivad joonis 3. ja tabel 4.

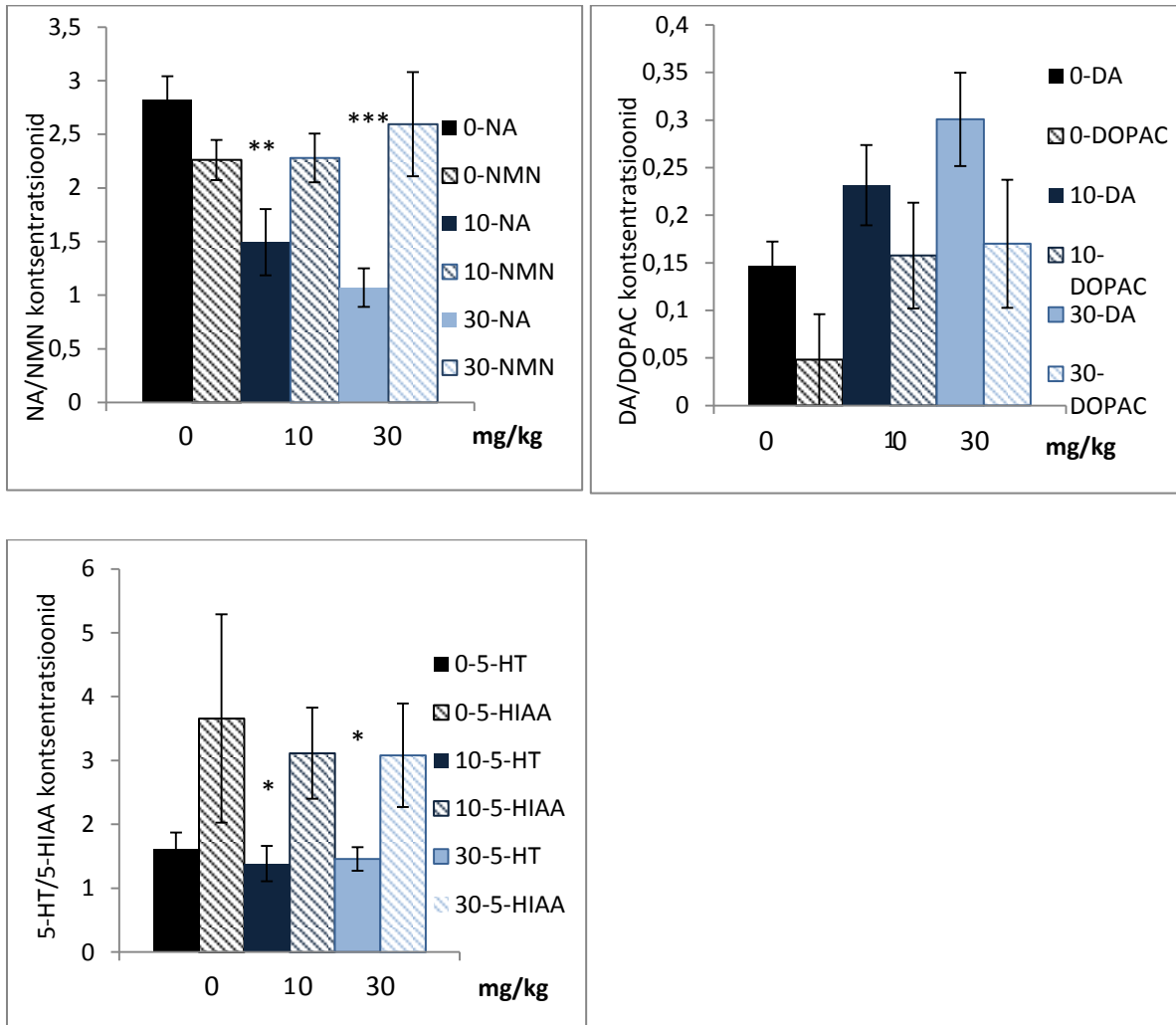
DSP-4 efekt avaldub NA sisalduste puhul nii frontaalkoores [$F(2,12)=18.7, p<0.05$], kui hipokampuses [$F(2,12)=76.7, p<0.01$]. Toksiini saanutel oli keskmine NA mõlemas piirkonnas madalam. 30 mg/kg närvimürki vähendas NA sisaldust frontaalkoores 18.7% ja hipokampuses 76.7% . 10mg/kg neurotoksiini saanute grupis oli NA taseme vähenemine mõnevõrra väiksem (hipokampuses -16.6% ja frontaalkoores -11.5%). DA keskmised tasemed frontaalkoores tõusid [$F(2,16)=7.905, p<0.05$] ja hipokampuses [$F(2,16)=20.733, p<0.01$]. LC denervatsioon mõjus ka serotoniini metaboliidi 5-HIAA

tasemetele [$F(2,16)=5.897$, $p<0.05$] frontaalkoores, vähendades selle sisaldust ajukoes. *Post hoc* test näitas, et lahustirühmast erineb DSP-4 saanud katseloomade hulgast LE-grupp ($p < 0.01$). Teiste monoamiinide sisaldusi vaadates ei esinenud olulisi erinevusi uudistamisaktiivsuse ja DSP-4 annuse vahel.

FRONTAALKOOR



HIPOKAMPUS



Joonis 3. Monoamiinide ja nende metaboliitide sisaldused hipokampuses ja frontaalkoores (keskmised \pm SEM). ** p < 0.05, *** p < 0.01.

Tabel 4. Monoamiinide ja nende metaboliitide sisaldused (pmol/mg) hipokampusesja frontaalkoores (keskmised±SEM).

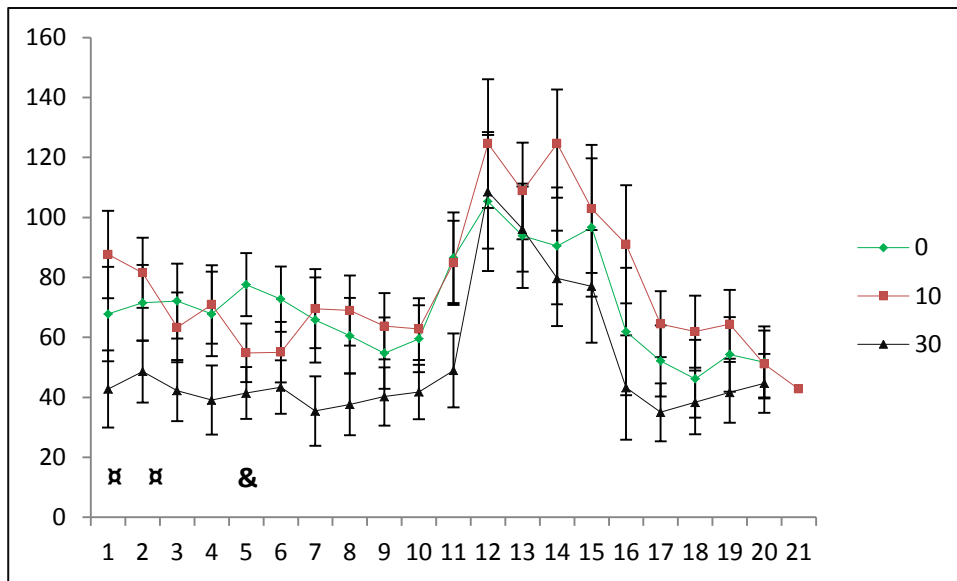
NA			DA		
dest. vesi	10 mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4	dest. vesi	10mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4
FC 3.33±0,38	1.71±0.28	1.16±0.11	0.51±0.43	0.67±0.66	0.83±0.49
HIP 2.82±0,10	1.49±0.15	1.07±0.06	0.14±0.01	0.23±0.01	0.31±0.01

5-HT			5-HIAA		
dest.vesi	10 mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4	dest. vesi	10mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4
FC 2.81±0.28	2.64±0.14	2.67±0.09	3.51±0.66	2.73±0.23	2.60±0.20
HIP 1.65±0.13	1.33±0.16	1.48±0.06	3.65±0.72	3.11±0.29	3.08±0.28

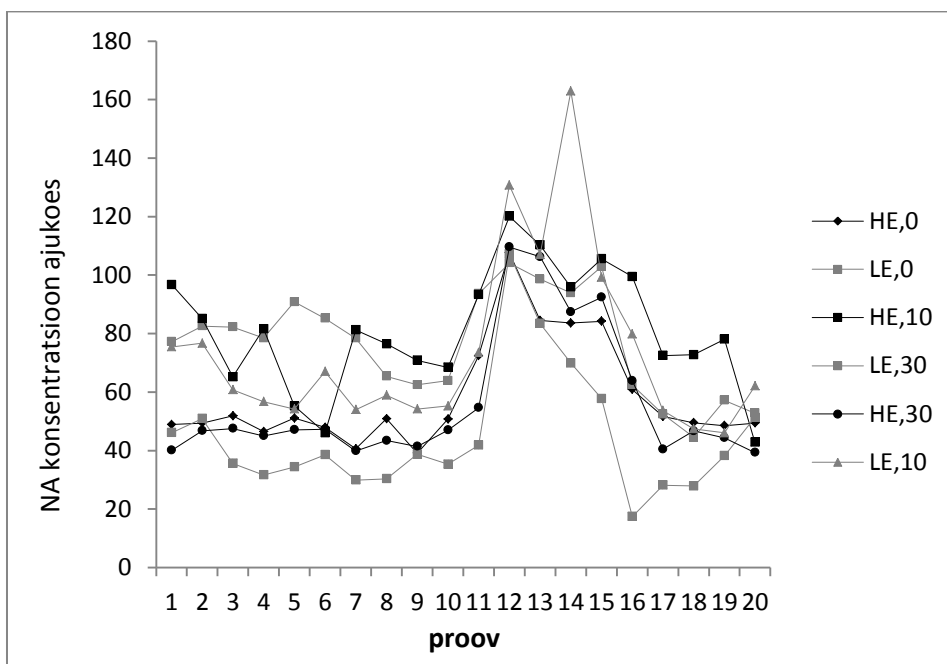
NMN			DOPAC		
dest. vesi	10 mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4	dest.vesi	10mg/kg DSP-4	30mg/kg DSP-4
FC 24±0,15	2,28±0,18	1,16±0,11	0,35±0,04	0,26±0,03	0,20±0,01
HIP 2,26±0,08	2,27±0,22	2,59±0,48	0,13±0,04	0,15±0,05	0,17±0,03

DSP-4 mõju noradrenaliini tasemetele ja locus coeruleus'e denervatsiooni efekt

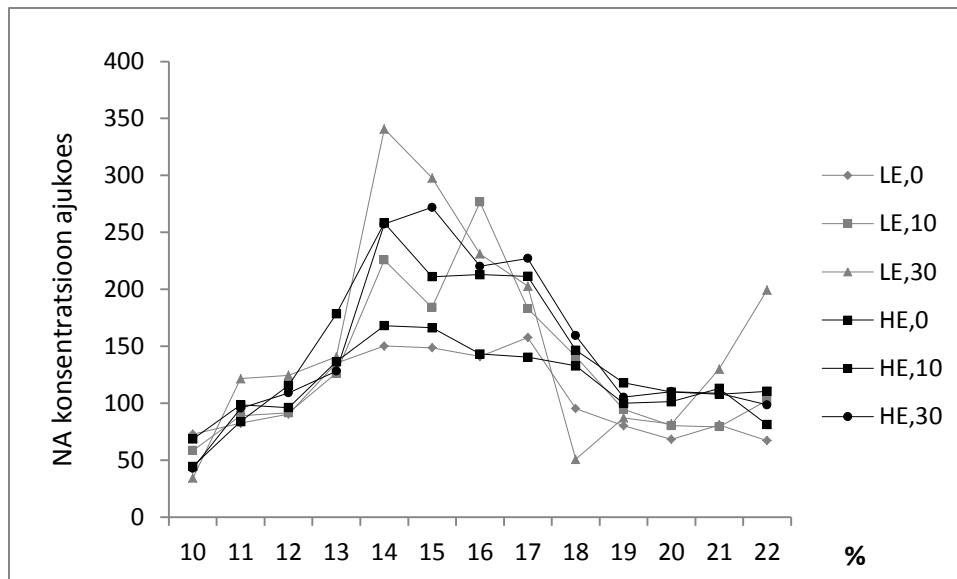
Noradrenaliini keskmine kontsentratsioon mikrodialüsaatides mõõdetuda prefrontaalkoores oli (53.7 ± 28.1 pg). Kontrollgrupil, kellele manustati DSP-4 asemel destilleeritud vett oli see (63.4 ± 30.2 pg). LC deneravtsioon ei avaldanud statistiliselt olulist mõju prefrontaalkoores NA tasemetele rakkudevälises ruumis, küll aga oli kohalikul depolarisatsioonil (50 mMol KCl) ja DSP-4 mõju sellele ravile [$F(2,19)=1.805$; $p=0.1916$]. NA vabanemine DSP-4 suure annuse (30 mg/kg) puhul on tunduvalt madalam (39.17 ± 5.49), võrreldes 10 mg/kg kohta (64.32 ± 12.63) ja lahusti puhul (Joonis 4.). Korduvmõõtmistega ANOVA ei näidanud statistilist erinevust ei uudistamisaktiivsuste ja DSP-4 annuse vahel ega DSP-4 ja NA rakuvälise vabanemise vahel ega ka NA vabanemispotensiaali (% baastasemest) ja DSP-4 annuse vahel ($p>0.05$). Vaata Joonis 5 ja Joonis 6.



Joonis 4. Noradrenaliini (NA) vabanemine KCl stimulatsiooni ja DSP-4 eri annuste 10 mg/kg (N=7) ja 30 mg/kg (N=9) ja lahuse (N=6) puhul. x- $p < 0.05$ vs. 0mg/kg; &- $p < 0.05$ vs. 10mg/kg.



Joonis 5 . Lokaalse KCl (50mMol)manustamisest tingitud depolarisatsioon, kus on näha rakuvälise NA vabanemine. Võrreldes erinevaid DSP-4 annuseid (0,10,30 mg/kg). $p > 0.05$



Joonis 6. NA vabanemispotensiaal (% tõus baastasemest) erinevate DSP-4 annuste (0, 10, 30 mg/kg) ja uudistamisaktiivsuse (LE,HE) suhtes. $p > 0.05$

ARUTELU

Nii nagu varasemalt kirjeldatud uurisime kuidas uudiskasti meetod võimaldab erineva uudistamisaktiivsusega katseloomi iseloomustada ja tõlgendada nende neurofüsioloogilisi erinevusi pärast ravimeite manustamist ja neurokeemilisi manipulatsioone.

Erinevused uudistamisaktiivsuse ja hüpothermilise efekti vahel

Kuigi meie uuring ei paljastanud olulisi erinevusi LE ja HE loomade vahel, kellega manipuleeriti samadel tingimustel, saime aimu serotoniini agonisti 8-OH-DPAT toimest ja selle seosest 5-HT_{1A} retseptoriga. 5-HT_{1A} agonisti 8-OH-DPAT suure annuse (0.3 mg/kg) maustamine katseloomadele vähendas stressist tingitud hüpertermiat nii LE kui HE katseloomadel, kuid olulisel määral vaid LE loomadel, tuues välja hüpothermia. Saadud tulemus on vastuolus eelneva uuringa (K.Kõiv, J.Harro, 2010), kus on leiti erinevus LE ja HE katseloomade vahel. Seda tulemust võib interpreteerida mitmeti, esiteks valiti 2010. aasta uuringusse LE ja HE äärmused, ehk need loomad, kellel oli väga kõrge ja väga madal uudistamisaktiivsus. Teine faktor, mis mängib kindlasti rolli on katseloomade vanus. Antud katses analüüsiti 18-kuu vanuste rottide uudistamisaktiivsuse andmed, kuigi on teada, et vanuse kasvades uudistamisaktiivsused võivad langeda (Mällo et al., 2007). Mõlemad

uuringud aga leidsid kinnitust LE-fenotüübi eripäradele ja serotoniini retseptori 5-HT_{1A} seost hipokampuse ja eesajukoore piirkonnaga (Alttoa et al., 2010). See leid sarnaneb ka kroonilise stressi raviskeemiga, mis arvatakse välja toovat depressiivseid seisundeid, mis on näidanud 5-HT_{1A} geeniekspressiooni alla-reguleerimist ja retseptoritega seondumist eesajukoores ja hipokampuses (Watanabe et al., 1993; Lopez et al., 1998; Kieran et al., 2010). Need tulemused annavad igastahes juurde kindlust LE/HE mõiste kasutamisele, mis aitab suuresti mõista depressiooni fenotüüpi ja selle põhjuseid. Edasistes uuringutes oleks veel kasu teiste ajupiirkondade lokeerimisega, mis aitavad retseptori 5-HT_{1A} funktsioneerimise erinevusi selgitada.

DSP-4 mõju monoamiinide ja nende metaboliitide sisaldustele frontaalkoores ja hipokampuses

Nii nagu oli oodatud, vähendas LC denervatsioon oluliselt NA sisaldust nii frontaalkoores kui hipokampuses, mis on kooskõlas varasemate uuringutega (Kõiv jt., 2011; Alttoa jt., 2005). Sellele tuginedes võib järeldada, et toksiin toimis ning selle mõju saab uurida seoses uudistamisaktiivsusega ning vaadates monoamiinide sisaldusi. Lisaks NA vähenemisele vähends LC denervatsioon 5-HT kogust hipokampuses ning tõstis DA kogust frontaalkoores. Sellest võib järeldada, et *locus coeruleus*'e denervatsioon mõjutab kõige rohkem noradrenergilist süsteemi, kuid seejuures omab mõju ka serotonergilisele ja dopamiinergilisele süsteemile.

Kokkuvõtte uurimustööst ja selle olulisusest

Depressioon on mitmekülgne haigus, mis mõjutab paljude inimeste tervist ja heaolu. Antidepressandid vähendavad depressiooni sümptomeid, kuid see toimub pikema aja jooksul. Selleks, et aina efektiivsemaid ravimeid välja töödata, on sellised uuringud, mis individuaalseid erinevusi uurivad igati tänuväärsed ja vajalikud. Antidepressandid mõjutavad kolme neurotransmitteri (serotoniini, noradrenaliini, dopamiini) tasakaalu nendes aju osades, mis reguleerivad meeleolu, füüsilisi tunde ja reaktsioone stressile. Tänapäeval on depressiooni ravimeid väga palju, kuna siiani ei ole täpselt kindlaks määratud milline on selle haiguse patogenees. Nagu varasemalt sai mainitud, ei ole põhiliste depressiooniga seotud neurotransmitterite (serotoniin, noradrenaliin ja dopamiin) õigeks

tasakaalustamiseks leiutatud ühte ravimit. Küll aga on erinevaid selektiivseid tagasihaarde inhibiitoreid (SSRI, SNRI, NDRI, NRI ja tritsüklilised antidepressandid).

Antud töös ilmnes serotoniini retseptori 5-H_{1A} tundlikkus vähe-uudistavatel katseloomadel ja närvimürgi DSP-4 abil kahjustatud *locus coeruleus*'e piirkond avaldas mõju noradreniliini tasemele, mis märgatavalt langes pärast denervatsiooni. Järgmise etapina oleks vajalik uurida ka teisi ajupiirkondi (näiteks amügdala ja basaaltuumad), kuna on arvatud, et nende piirkondade neurotransmitterite väärtalitus on üheks depressiooni põhjustajaks (Delgado ja Moreno, 2000).

Kriitika

DSP-4 mõju uurimisel võiks lisainformatsiooni saada monoamiinide sisaldustest ka naadluvas tuumas (*nucleus accumbens*). Naalduv tuum on oluline limbilise ja motoorse süsteemi vahendaja, ühendades motivatsiooni tegevusega (Feldman jt., 1997). Sealt võiks informatsiooni saada ka küsimusele, kas madala uudistamisaktiivsuse puhul on tegemist motivatsioonilise puudujäägiga või motoorse kahjustusega.

Szot jt. (2010) väidavad, et DSP-4 ei ole selektiivne *locus coeruleus*'e noradrenergiline neurotoksiin ja mõjutab ka teisi ajupiirkondi. Seega võivad muutused monoamiinide sisaldustes olla ka mujalt pärit ning vajavad edasist uurimist.

Antud töö suurimaks puuduseks oli katseloomade vanus. Töö põhirõhk oli erinevalt reguleeritud noradrenergiliste ja serotonergilist mehhanismide kaardistamisel erineva uudistamisfenotüübiga katseloomadel. Kuigi DSP-4 ja 8-OH-DPAT avaldasid toimet, olid need mõeldud vahenditena erinevuste välja toomiseks.

Tänuavaldused

Soovin tänada prof. Jaanus Harrot, Kadri Kõivi, Karita Raudkivi ja Kariina Laasi abi ja seletuste eest.

Käesolevaga kinnitan, et olen korrektselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele.

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Lugupidamisega,

Madli Nuut

KASUTATUD KIRJANDUS

Albert Ferrés-Coy ,Noemí Santana ,Anna Castañé ,Roser Cortés, María C. Carmona, Miklos Toth, Andrés Montefeltro, Francesc Artigas, Analía Bortolozzi (2013). Acute 5-HT_{1A} autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions. *Psychopharmacology*. 225, 61–74

Ants Kask, Jaanus Harro, Päivi Tuomainen, Lembit Rägo, Pekka T. Männisto (1997). Overflow of noradrenaline and dopamine in frontal cortex after [N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine] (DSP-4) treatment: in vivo microdialysis study in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 355, 267–272

E. Calcagno, M. Carli and R. W. Invernizzi (2006). The 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*. 96, 853–860

Jaanus Harro, Riina Haäidkinda, Maarike Harro, Ali-Reza Modir, Per-Goöran Gillberg, Rein Pähkla , Vallo Matto , Lars Orelund (1998). Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioural and biochemical effects of DSP-4 treatment. *European Neuropsychopharmacology*. 10, 5–16

Jamie L. Scholl , Na Feng , Michael J. Watt , Kenneth J. Renner , Gina L. Forster (2009). Individual differences in amphetamine sensitization, behavior and central monoamines. *Physiology & Behavior*. 96, 493–504

Joanna Dabrowska, Przemyslaw Nowak, Ryszard Brus (2008). Reactivity of 5-HT_{1A} receptor in adult rats after neonatal noradrenergic neurons' lesion — Implications for antidepressant-like action. *Brain Research*. 1239, 66-76

Kadri Kõiv ja Jaanus Harro (2010). Differences in 5-HT_{1A} receptor-mediated hypothermia in rats with low or high exploratory activity. *Behavioural Pharmacology*. 21, 765–768

Lynne E. Rueter, Claude de Montigny, Pierre Blier (1998). In Vivo Electrophysiological Assessment of the Agonistic Properties of Flibanserin at Pre- and Postsynaptic 5-HT_{1A} Receptors in the Rat Brain. *Synapse*. 29, 392–405

Marzena Ferdyn-Drosik , Przemysław Nowak¹, Kamila Bojanek¹, Michał Bałasz, Jacek Kasperski, Dariusz Skaba, Rafał Muchacki, Richard M. Kostrzewa (2010). Neonatal DSP-4 treatment impairs 5-HT_{1B} receptor reactivity in adult rats. Behavioral and biochemical studies. *Pharmacological Reports* . 62, 608–620

Riina Häidkinda , Toomas Kivastikb , Marika Ellera , Ivo Koltsc , Lars Orelandd , Jaanus Harro (2002). Denervation of the locus coeruleus projections by treatment with the selective neurotoxin DSP-4 [N(2-chloroethyl)-N-ethyl-2- bromobenzylamine] reduces dopamine release potential in the nucleus accumbens shell in conscious rats. *Neuroscience Letters* .332, 79–82

Sadia Oreland, Karita Raudkivi, Lars Oreland, Jaanus Harro, Lotta Arborelius, Ingrid Nylander (2011). Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. *Brain Research*. 1405, 57-68

Tanel Mällo, Aet Alttoa, Kadri Kõiv, Margus Tõnissaar, Marika Eller, Jaanus Harro (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioural Brain Research*. 17, 269–281

Tanel Mällo, Kadri Kõiv, Indrek Koppel, Karita Raudkivi, Ain Uustare, Ago Rinken, Tõnis Timmusk, Jaanus Harro (2008). Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain Research*. 1194, 110-117